

## 東北大学遺伝生態研究センター通信 No. 27

著者	東北大学遺伝生態研究センター
発行年	1994-12
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/49064">http://hdl.handle.net/10097/49064</a>



# 東北大学

## 遺伝生態研究センター通信

1994. 12. No.27

### 特集：‘フザリウム菌の遺伝生態’

#### 特集によせて

東北大遺伝生態研究センター 服 部 勉

フザリウム菌は、土壤中に広く分布する糸状菌で、植物病原性の菌も多く含まれている。この菌の生態に関する研究は、従来より植物病理学分野で、進められてきた。病原性フザリウム菌には、変異性が大きく、分子生物的手法による研究が、強く望まれる。本センターでは、平成5年度より岐阜大学農学部百町満朗教授との共同利用研究で、この課題を取り上げている。

平成6年7月25日には、さらに広い視野でこの課題を検討し、全国的な研究者の交流と協力のネットワークづくりをめざして、表記と同じタイトルのワークショップを開いた。本特集は、当日の話題提供の概略をまとめたものである。

#### 目 次

特集：‘フザリウム菌の遺伝生態’によせて	東北大遺伝生態研究センター 服 部 勉	1
体細胞和合性群から見たアズキ萎凋病菌の分布	北海道大学・農学部 近 藤 則 夫	2
インゲン根腐病菌小型分生孢子の生態学的意義	岐阜大学・農学部 百 町 満 朗	3
<i>Fusarium oxysporum</i> の病原性分化とその遺伝的背景	農水省・九州農試 並 木 史 郎	5
フザリウム萎凋病菌と DNA 解析	北海道医療大学 国 永 史 朗	6
宿主特異的毒素を生産する <i>Alternaria</i> 属病原菌群の遺伝的類縁性	名古屋大学・農学部 草 場 基 章 柘 植 尚 志	8
No.23別冊特集：アンケート「微生物生態と分子生物の出会い」への追加回答	国際基督教大学・教養学部 千 浦 博	10

## 体細胞和合性群から見たアズキ萎凋病菌の分布

北海道大学・農学部 近 藤 則 夫

アズキ萎凋病は、1983年に北海道中央部の水田転換畑で発見された病気である。当初水田転換畑で問題となると恐れられたのは、*Phytophthora vignae* による茎疫病であった。この病気の対策には比較的抵抗性の品種「寿小豆」が奨励され、作付け率が20%に達した地域もあった。ところが、「寿小豆」は萎凋病には全く弱く、7月末に全株枯死する圃場もあり、惨状を呈した。

萎凋病の病原菌は、*Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola* と報告され、この中に3つのレースが存在することが明らかになっている。発生が見られた各地域から萎凋病菌を集め、そのレース検定を行ったところ、レースの偏りは見られず、どの圃場でも3つのレースが存在するものと考えられた。1本の罹病株から3つのレースが分離されることもあった。ただ、全体的にみて、レース1が他のレースより多く分離される傾向があった。

近年、硝酸塩非利用突然変異株により、ヘテロカリオン形成の有無を肉眼的に観察できるようにし、体細胞和合性群 (VCG: Vegetative Compatibility Group) の分類が能率的にできるようになった。VCGと*Fusarium oxysporum*の各分化型はよく一致しており、多数の報告がなされている。アズキ萎凋病菌についても、この分類方法により検討した。

その結果、調べた106菌株中91菌株は同一のVCGに属し、3つのレースすべてを含んでおり、いずれの地域にもこのグループが存在した。そのほかに単独のVCGと少数の菌株を含むVCGがあった。ただ興味深いのは、先の大VCGと1つの小VCG両方と相補性を示す「橋渡的な」VCGがあり、しかもこれが萎凋病の発生地域の周辺に近いところのみに存在していることである。新しいVCGを形成していく多様化の段階を示しているのだろうか。

先に述べたように、本病の分布は北海道の中央部から一部西部にかけてであり、だいたい石狩川流域あるいは天塩川流域の水田転換畑に主として発生しているとみてよい。ところが、アズキの大産地で、

北海道内のアズキ栽培面積の40%を占める十勝地方には、未だ発生が認められていない。何故発生しないのか、興味深いところである。

*Fusarium* 病害を含む土壌伝染性病害には発病抑制型土壌が存在することが知られている。はたして十勝地方の土壌もこれなのか、病原菌を十勝土壌に接種してみた。しかし、アズキには同様な萎凋病の症状が現れ、発病率に差はなかった。また、十勝地方は土壌凍結地帯であるので、土壌凍結の厚膜孢子生存に対する影響を調べたが、16週間以上土壌中菌量は変わらず、十勝地方の凍結期間以上生存することから、土壌凍結の影響はないと推定した。品種についても、現在最も多く栽培されているのは「エリモショウズ」で、この品種は萎凋病に罹病性の品種であり、しかも両地域で栽培されており、十勝地方にあるいは萎凋病発生地に特別な品種が栽培されているわけではない。

さらに、十勝地方のアズキ栽培圃場土壌から*Fusarium oxysporum*を600株以上分離し、すべてについて接種試験を行ったが、全く萎凋病菌は分離されなかった。

十勝地方と発生地の*Fusarium oxysporum*の遺伝的多様性が存在するの否か、アズキに対し非病原性の*Fusarium oxysporum*についても体細胞和合性群による分類を試みた。萎凋病発生土壌からの非病原性株、接種試験で確認した十勝地方の非病原性株合計198株を分類すると、単独の自己和合性株を含めて35 VCGとなり、単独自己和合性株を除くと両地方で共通なVCGは15、発生地単独は2、十勝地方単独は7であった。含まれる菌株数が最も多いVCGには、発生地の10、十勝地方の22菌株が含まれ、それぞれの地域中の割合は11%、19%を占めた。VCGを両地域まとめて菌株数の多い方から並べたとき、10番目までのVCGに含まれる菌株の割合は発生地、十勝地方それぞれ71%、78%となり、そのなかにその地域単独のVCGは認められなかった。

また、アズキ萎凋病菌との相補性も同時に検討したが、同一の VCG に含まれることはなかった。今後、各 VCG 間の関係を DNA レベルで検討したいと考えている。

萎凋病の防除法として、抵抗性品種の利用あるいは水稻の 4～5 年の栽培があげられ、現在のところ最も効果が高いと考える。しかし、「エリモショウ

ズ」など良質品種の需要は依然高いので、十勝地方に病原菌が侵入したときに、どのように対処するか考えておかねばならない。病原菌の分布がどのような要因で制限されるのか、あるいはこれと関連して分化型がどのようにして生じてくるのか、そのメカニズムを知りたいと考えている。

## インゲン根腐病菌小型分生胞子の生態学的意義

岐阜大学・農学部 百 町 満 朗

### ＜はじめに＞

インゲン根腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*) による被害は非宿主を組み込んだ輪作体系を用いることで著しく軽減される。一方、本病原菌は非宿主を数年連作しても菌量が急激に減少することなく土壤中に存在する。このことは本菌の病原性が宿主のないところで低下するものの、その腐生能力は非常に高いことを意味している。ところで本菌は大型分生胞子を産生するが小型分生胞子はほとんど産生しないとされており、日本産の菌株では小型分生胞子の産生は全く認められていなかった。一方、我々は本菌の保存培養株に小型分生胞子を多量に産生する株を見いだした。また、その株を継代培養や単胞子分離することにより、小型分生胞子のみを多量に産生する菌株を得た。小型分生胞子を産生する株の病原性は著しく低い、腐生能力は逆に高い傾向を示した。本菌は宿主の存在下では寄生性の強い大型分生胞子型を保っているが、非存在下では腐生性の強い小型分生胞子型に変化する可能性が示唆された。さらには、畑土壤中で小型分生胞子型に変化したものが、宿主であるインゲンが畑に入ることにより再び大型分生胞子型に変化する可能性もある。

本研究は、小型分生胞子の染色体 DNA の構造、病原性、土壤静菌作用に対する感受性、発芽力および土壤中での生存力を、本菌の他の繁殖器官である大型分生胞子や厚膜胞子と比較し、本菌における小型分生胞子の生態的意義を明らかにするのが目的で

ある。また、本菌の大型から小型、あるいは小型から大型への変化が自然界で実際に生じているのかを、また、分生胞子の形態分化に、あるいは寄生性や腐生性の分化に染色体 DNA の構造がどう関わっているかを明らかにすることも目的としている。

### ＜研究経過＞

インゲン根腐病菌の岐阜大学保存菌株 (G-1、1978年に北海道立十勝農業試験場の罹病株から分離) から小型分生胞子が確認され、さらに単胞子分離を行った結果、大型分生胞子のみを産生する大型株、小型分生胞子のみを産生する小型株、両者の混在した混在株に分けられた。小型株は大型株よりも病原性が著しく低かったが、分生子柄の形態およびインゲンへの病原性の有無から小型株も *F. solani* f. sp. *phaseoli* であると認められた。大型分生胞子と小型分生胞子の生存力の間にはほとんど違いは認められなかった。また、大型由来の厚膜胞子と小型由来の厚膜胞子の間にも生存力に差はなく、いずれもわずかながら大型分生胞子と小型分生胞子の生存力より高かった。

### ＜研究結果＞

本研究では、インゲン根腐病菌の岐阜大学保存菌株 (G-1) を単胞子分離して得た大型株の S-3 と小型株の S-16、S-37 を用いて、大型株からの小型分生胞子の出現および小型株からの大型分生胞子の出現について検討した。比較のために分離場所

や分離年度がG-1と異なるT-1、T-2も用いた。これらはいずれも1992年に十勝地方の罹病株から分離された比較的新しい大型株である。出現の有無はPDAでの継代培養、単胞子分離、薬剤（ベノミル、アクチジオン、NTG）処理および各植物培地を用いた培養で調べた。

その結果、大型株（S-3）からの小型分生胞子の出現は、PDAでの継代培養、ベノミル+NTG処理で認められた。小型株からの大型分生胞子の出現は、S-16はPDAでの継代培養とインゲン培地を用いた培養で認められ、S-37はベノミル+NTG処理とインゲン培地を用いた培養で認められた。とくに、ベノミル+NTG処理によって認められた大型分生胞子と小型分生胞子の出現率は高かった。これらのことから、大型株と小型株の間には連続性があることが明らかになった（図-1）。

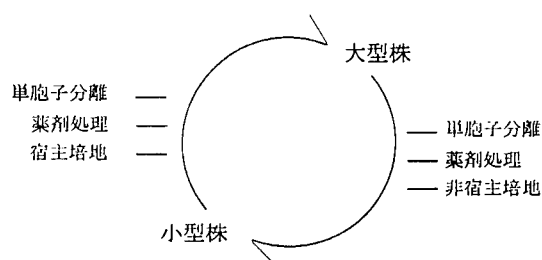


図-1 *In vitro* における *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* の大型株と小型株の連続性

さらに、圃場分離株で大型株のT-1とT-2からもトウモロコシ培地およびアルファルファ培地を用いた培養で、またT-1からはベノミル+NTG処理で小型分生胞子の出現が認められた。このことは、大型株からの小型分生胞子の出現はそれほど特異的な現象ではなく、自然界でも頻繁に起きている可能性を示唆している。また、インゲン培地を用い

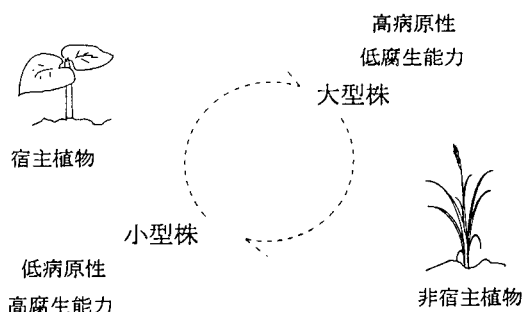


図-2 圃場における *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* の大型株と小型株の連続性

た培養で小型株から大型分生胞子が出現したことを考え合わせると、実際の圃場でもインゲンが入ること腐生的に生存していた小型株から大型分生胞子が出現している可能性も出てきた（図-2）。

大型分生胞子と小型分生胞子の腐生能力をケンブリッジ法により比較したところ、宿主であるインゲンと非宿主のコムギのいずれを基質に用いても小型分生胞子の方が大型分生胞子よりも基質着生率が高かった。すなわち小型株は競合的腐生能力において大型株によりも勝っていた。

大型株、小型株および混在株のDNA構造解析を行ったところ、M13ファージDNAをプローブに用いたフィンガープリントでは、抽出したDNAを制限酵素 *EcoR* I、*Bam* III、*Xba* I、*Sal* I で切断後サザンハイブリダイゼーションを行ったが、バンドは出現しなかった。

大型株、小型株および混在株から抽出したDNAを制限酵素 *EcoR* I と *Bam* III で切断後、*Alternaria alternata* の rDNA をプローブに用いて RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析したところ、G-1由来の大型株と小型株およびT-1由来の大型株と小型株の間に多型が検出された。バンドパターンは大型株間、小型株間でそれぞれほぼ一致したが、大型株と小型株の間では異なった。混在株は大型株のパターンをもつものと小型株のパターンをもつものに分かれたが、両方のパターンを合わせもったものはなかった。

RFLP解析において、制限酵素 *Sal* I と *Xba* I を用いたときも多型が現れたが、*EcoR* I や *Bam* III をもちいたときほど顕著なパターンは現れなかった。しかし、G-1由来の大型株と小型株の間、あるいはT-1由来の大型株と小型株の間で差が認められた。由来の異なる大型株間、あるいは小型株間にパターンに差はなかった。

PCR (polymerase chain reaction) を用いた RAPD (random amplified polymorphic DNA) 解析を行ったところ、プライマー RC08 で増幅した大型株と小型株のDNAで多型が検出された。混在株はS-12は大型株と同じバンドパターンに、混在株G-1は小型株と同じパターンになった。プライマーRC09を用いたときもS-12は大型の、G-1は小型のパターンを示した。この結果はrDNA領

域の RFLP の結果と同じだった。

### ＜ま と め＞

これまでインゲン根腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*) は小型分生胞子をほとんど産生しないとされてきたが、本研究の結果、意外と簡単に小型を出現させ得ることが明らかになった。また、小型株から大型株分生胞子を出現させることも可能であった。すなわち大型株と小型株の間に連続性が認められた。小型株は大型株より腐生能力が高いことから、宿主のない生存に不利な環境下では大型株から小型株に変化して生存している可能性がある。また、宿主であるインゲンに感染することで小型株は再び大型株に変化する可能性もある。このような精妙な生存戦略をインゲン根腐病菌が自然界で本当に備えているかどうかは興味のもたれるところである。今後、小型分生胞子の生態的意義を明らかにするためには圃場レベルでの小型分生胞子の発現機構を詳

細に調べる必要があろう。

ところで、DNA 構造解析の結果、大型株と小型株が全く異なる構造を示すことが明らかになったが、この事実は大変な驚きであった。元々同じ菌から出現した菌株間でこのような多型が生じるということはほとんど考えられないことである。例えば、保存領域とされている rDNA 領域で同一の菌が多型を示すことはありえないとされる。なぜなら、rDNA の反復配列は約200コピーあるが、大型株とそれから出現した小型株の間のバンドの位置が全く異なって出現するためには200コピーある配列の全て同じ場所が同時に変化しなければならないからである。これは確率的に不可能である。今のところ大型株と小型株でなぜ多型が現れたかについて十分に説明することはできないが、現象自体が非常に興味深く、多型の出現についての今後の研究が期待される。

## *Fusarium oxysporum* の病原性分化とその遺伝的背景

農水省・九州農試 並 木 史 郎

*Fusarium oxysporum* は、世界各地の耕地土壌中にごく普通に生息する糸状菌（かび）の一種である。本菌には根部から植物体内に侵入後、維管束内で増殖し、宿主に対して黄化・萎ちょう・枯死等の症状をひきおこすグループ、いわゆる植物病原菌として悪名高い一群が存在する。本病原菌は様々な栽培植物に深刻な被害をもたらす、産地の崩壊という悲惨な結末を迎えることもしばしばである。しかしながら、植物に対して手当たり次第に総攻撃を加えるわけではなく、その病原性（宿主範囲）は明瞭に分化している。すなわち、本菌群には、形態的には全く区別できないが、特定の植物種にのみ病害をひきおこす「分化型」や、同一種内の特定の品種群にのみ病害をひきおこす「レース」といった多様な病原性変異系統が存在する（例えば、キュウリを加害する分化型は、宿主にひきおこす病徴から「キュウリつる割病菌」と呼ばれる）。

本稿では、ウリ科植物つる割病菌を例にとり、*Fusarium oxysporum* の病原性分化とその遺伝的背景について紹介する。

### 1. ウリ科植物つる割病菌の病原性分化

わが国では、10種以上のウリ科植物と、それらのおびただしい数の品種が栽培され、食品・化粧品および接ぎ木栽培の台木として利用されている。こうした植物側の種および品種の多様性に対応して、病原菌側もこれまで報告された以上に多様な系統が存在することが予想される。そこで全国各地からウリ科植物つる割病菌5分化型の50菌株を収集し、ウリ科植物12種23品種に対する病原性を調査したところ、キュウリ菌はキュウリにのみ、スイカ菌はスイカにのみ病原性を示した。メロン菌では、メロンの特定の品種群にのみ病原性を示すレースや系統が存在した。これに対し、ユウガ

オ菌はユウガオ・セイヨウカボチャおよびクロダネカボチャに、ツルレイシ菌はツルレイシ・ユウガオ・セイヨウカボチャおよびクロダネカボチャに病原性を示し、両分化型は互いに宿主範囲が重複していた。すなわち、ウリ科植物つる割病菌は複数属の植物に病原性を示すものから、特定の品種群にのみ病原性を示すものまで多様な菌系で構成されていた。

ユウガオやツルレイシはそれほど品種改良が進んでおらず、野生種の趣を残している。一方、メロンでは改良に次ぐ改良の結果、品種が高度に分化している。元々は宿主範囲の広い菌系が宿主側の分化に対応して病原性を分化させていったのかも知れない。宿主と病原菌との共進化を考えるうえで興味深い材料と言えよう。

## 2. ウリ科植物つる割病菌分化型間の遺伝的類縁性

様々な生物現象が遺伝子 (=DNA) で語られるようになった今日では、病原性の分化を DNA レベルの情報で説明しようとするのは、ごく自然な成り行きである。そこで、DNA フィンガープリント分析により、ウリ科植物つる割病菌分化型間の遺伝的類縁性を調査した。ユウガオつる割病菌03-05118株の染色体 DNA ライブラリーの中から、rDNA とハイブリダイズせず、染色体 DNA と強くハイブリダイズした4種類の反復 DNA 配列クローンを単離し、プローブとして用いた。

その結果、

- ① ウリ科植物つる割病菌の菌株は、分化型と一致する6つの遺伝的グループを形成し、各

グループ内の菌株間の類縁係数は75%以上であった。

- ② ユウガオ・キュウリ・スイカおよびツルレイシつる割病菌の菌株は、それぞれの遺伝的グループを形成した。これに対し、メロンつる割病菌では2つの遺伝的グループに分かれた。一方はメロンおよびメロンの近縁種であるマクワウリの両者に、他方はメロンにのみ病原性を示す菌株群であった。
- ③ トマト、ナス、ダイコンなどウリ科以外の植物を加害する分化型の菌株は互いに識別が可能であり、しかもウリ科植物つる割病菌とは類縁性が低いことが判明した。
- ④ 宿主範囲が重複していたユウガオつる割病菌とツルレイシつる割病菌の菌株は、互いに類縁性が明らかに異なる遺伝的グループを形成し、DNA フィンガープリント法によりこれら分化型を容易に識別できた。

したがって、ウリ科植物つる割病菌は病原性のみならず、DNA レベルでも分化した種内変異系統であることが明らかとなった。

## 3. おわりに

DNA フィンガープリント分析により、きわめて高感度に *F. oxysporum* の種内変異を検出できることが明かとなった。しかしながら、この方法では DNA の抽出をはじめとする煩雑な操作が必要であり、しかも RI を使用するため、様々な制約が伴う。したがって、技術的な改良が必要であり、簡易抽出した DNA に PCR を行う簡便法 (RAPD法) を検討中である。

# フザリウム萎凋病菌と DNA 解析

北海道医療大学 国・永 史 朗

## はじめに

フザリウム萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum*) は、各種植物に萎凋性の病害をおこす土壌伝染性の糸状菌である。

本菌には著しい宿主特異性が認められ、多数の病原性変異系統が存在する。異なる植物種に寄生するものは「分化型」、同一植物種の異なる品種に寄生するものは「レース」としてそれぞれ呼ばれ、その

科	属	種	種内群	個体
---	---	---	-----	----

ユビキノン系

rDNAコード領域

GC含量

DNA相同性  
タンパク質パターン  
rDNAITS領域

酵素多型  
mtDNA RFLP

反復DNA指数法  
PCR RAPD

PFGE

図 菌類の分子分類学的研究において利用される種々の方法の有効範囲

数は現在120以上にのぼる。

本菌は有性世代を持たないため、系統間の遺伝学的研究はほとんど手付かずであった。最近、硝酸塩利用欠損変異菌 (*nit mutant*) を利用した体細胞和合性群 (VCG) の類別が行われ、分化型は相互に不和合性であり、同一分化型内には複数の VCG が存在することが示された。また、レースと VCG の関係は必ずしも相関しないことが示されている。

近年、VCG の類別に加え、種々の分子生物学的手法 (図) による DNA の解析も試みられ、系統や VCG 間の遺伝的な類縁関係が明らかにされつつある。ここでは、トマトに萎凋性の病害をおこす系統を中心にその概要を紹介する。

## DNA-DNA ハイブリダイゼーション

本法により算出される DNA 相同性値は、現在、細菌や酵母菌では「種」の分類の重要な指標となっている。近年、植物病原菌類でもこの手法が応用され、一般に同一種に属するものはほぼ60-70%以上の相同性を示すとされている。

この手法によりフザリウム萎凋病菌は63%以上の相同性を示し、同一種に分類されることが明らかにされた。また同一分化型に属するものは少なくとも90%以上を示し、本法は分化型の識別にも応用が可能である。

本菌の分化型の類別はあくまでも宿主と病原菌の相互作用に基づくものであり、これまでその遺伝的關係は不明であったが、この研究により遺伝的な関

係を反映したものであることがはじめて証明された。

## DNAのRFLP解析

### 1) DNA フィンガープリント

菌類 DNA の反復領域の割合 (10-62%) は菌種によりさまざまである。本法は非コード領域の RFLP 解析法であり、菌類では種内群の類別や個体識別に応用されている。

本菌の一分化型であるトマト萎凋病菌ではこの手法により、明らかな遺伝的多型が観察されている。多型は同一

VCG 内では小さいが、VCG 間では著しく高いことが示された。さらにその報告では、本分化型内の RFLP パターンに基づく遺伝的類似度の値が、分化型間で得られる値よりもむしろ低くなる場合が示されている。このことは本法はあくまでも識別の手段であり、基本的には遺伝的に類縁性の高いグループに応用すべきであり、また研究の目的に応じてプローブの種類を使い分けなければならないことを示唆する。

ウリ科植物を加害する分化型は、互いに遺伝的に近縁な関係にあることが知られている。このような分化型間では本法によりその識別が可能であることが報告されている。同様な遺伝的關係にあるアブラナ科またはマメ科植物に寄生する分化型間の識別においても、本法の利用が期待される。

rDNA の非コード領域である ITS 領域についても RFLP 解析が試みられているが、本菌ではこの部分に多型が認められたという報告は現在まだない。

### 2) ミトコンドリア DNA の RFLP 解析

菌類の mtDNA の大きさはおよそ50kb 程度である。このため RFLP 解析は比較的容易に行え、菌類では種および種内群の類別に主として用いられている。

トマト萎凋病菌の他いくつかの分化型内では、一般に同一 VCG のものは均一な mtDNA を有し、VCG 間では明らかに異なることが観察されている。mtDNA や核 DNA の RFLP 解析結果は、



分化型には明らかに遺伝的に独立した複数の個体群 (VCG) が含まれ、それらの間で遺伝子拡散が起きていないことを示唆する。またレースの分化は VCG の遺伝的枠内でそれぞれ独立して起きていることを示唆する。

菌類の mtDNA 多型は塩基の挿入や欠失によることが多い。このため分子時計の仮説に基づく系統図の作成はあまり意味をなさない。mtDNA の変異は生物進化の上でどのような意義を持つのか、まずその解明が待たれる。

### 3) PCR-RAPD解析

単一のオリゴヌクレオチド (通常10 mer ほど) をプライマーとしてPCRを行い、DNA フィンガープリントを簡便に検出する手法である。

本法は比較的新しい技術であり、本菌での応用例はまだ少ないが、一般にVCGの識別に有効であると考えられる。これまでにレース識別に有効であるとする報告があるが、それはいずれも同一VCG内に単一のレースしか存在しない分化型での研究結果である。トマト萎凋病菌のように同一VCG内に複数のレースが存在する場合は、そのレースの識別はあまり期待できない。

### PFGE による泳動的核型解析

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) の手法を応用すると、これまで比較的困難とされていた菌類の核型解析が可能となる。

一般に核型は生物種属に特有で正しく保存されるが、菌類の泳動的核型の研究結果は必ずしもそうではない。同一種内のものでも染色体サイズの大きさ、またその数において著しい多型を示すことが観察されている。トマト萎凋病菌では同一VCG内でも著しい染色体多型が認められ、一般に3 Mb以下の比較的小さなサイズの染色体で特に顕著である。また、この多型とレースとの間には一定の関係が今のところ認められていない。

染色体多型が生じる原因は現在のところほとんどわかっていない。この多型を引き起こす変異は、特に有性世代を持たない菌種ではおそらく中立的なものであろうと考えられる。

### おわりに

フザリウム萎凋病菌は決して均一な遺伝子セットを持った菌群ではなく、多数の個体群 (VCG) が絶え間ない偶然の変異で揺れ動き、非常に個性的に独自の変異をつくりだしている集団のようである。

現在、非病原性のフザリウム菌についてはDNAレベルでの遺伝学的研究が遅れている。おそらく広い生態的地位を占める非病原性の菌群では病原性の菌群よりもさらに遺伝的多様性が著しいことが予想される。これらの菌群の遺伝的構成が解明されたとき、はじめて病原性菌群の真の遺伝子像が浮き彫りにされるであろう。

## 宿主特異的毒素を生産する *Alternaria* 属病原菌群の遺伝的類縁性

名古屋大学・農学部 草場基章・柘植尚志

*Alternaria* 属糸状菌には、宿主特異的毒素を生産する7種の植物病原菌が存在する (表-1)<sup>1)</sup>。宿主特異的毒素とは、宿主植物のみに毒性を示す病原糸状菌の代謝産物であり、病原菌の宿主選択性の決定因子として位置付けられている<sup>1)</sup>。これら毒素は、いずれも低分子量物質であり、極めて低濃度 ( $10^{-9}$ ~ $10^{-8}$  M) で宿主植物にのみ毒性を示す。筆者らは、宿主特異的毒素を生産する *Alternaria* 属

病原菌の病原性分化の分子機構の解明を目的として研究を進めている。

宿主特異的毒素を生産する *Alternaria* 病原菌のほとんどは、発生当初、それぞれ新種として同定・分類された。しかしながら、Nishimura ら<sup>1, 2)</sup> は、これら病原菌の形態的特徴が地球上に広く分布する典型的な腐生菌 *A. alternata* と一致することを観察し、これらが *A. alternata* の病原性に関する変

表-1 宿主特異的毒素を生産する *Alternaria* 属植物病原菌

病原菌		病 名	毒 素	宿主植物
病原型	従来の病原菌名			
<i>A. alternata</i> apple pathotype	<i>A. mali</i>	リンゴ斑点落葉病	AM毒素	インド、デリシャス系統のリンゴ
Japanese pear pathotype	<i>A. kikuchiana</i>	ナシ黒斑病	AK毒素	二十世紀ナシなどの日本ナシ
tobacco pathotype	<i>A. longipes</i>	タバコ赤星病	AT毒素	<i>Nicotiana</i> 属植物
rough lemon pathotype	<i>A. citri</i>	ラフレモン brown spot	ACR毒素	ラフレモン
tangerine pathotype	<i>A. citri</i>	タンゼリン brown spot	ACTG毒素 ACT毒素	ダンシータンゼリンなど
tomato pathotype	<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	トマトアルタナリア 萎枯病	AAL毒素	First, Earlypak7 などのトマト
strawberry pathotype		イチゴ黒斑病	AF毒素	盛岡16号イチゴ

異系統であると考えた。そこで、これら病原菌を、腐生的 *A. alternata* がそれぞれの宿主特異的毒素を獲得することによって特定の植物に病原性を示すようになった病原型 (pathotype) として位置付けることを提案した<sup>1, 2)</sup>。しかしながら、これら病原菌が完全世代を持たないこと、胞子形態が変異しやすいことなどの理由から、病原型仮説は未だ広く採用されるには至っていない。

筆者らは、*Alternaria* 属植物病原菌の遺伝的類縁性をリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の解析に基づき調査し、病原型仮説の再評価を試みた<sup>3)</sup>。rDNA は核ゲノム中に存在する典型的な反復 DNA 配列である。現在までに rDNA の制限酵素断片長多型 (RFLP) や塩基配列の比較解析が、糸状菌の種分類に有効であることが報告されている<sup>4)</sup>。*A. alternata* の基準株、宿主特異的毒素を生産する 7 種の病原菌、および形態的に *A. alternata* と明確に異なる他種を含む 99 菌株について、rDNA の RFLP 解析を行った<sup>3)</sup>。制限酵素 Xba I を用いた解析によって、宿主特異的毒素生産菌群から複数の多型が検出された。しかしながら、それら多型は特定の毒素生産菌に特徴的なものではなく、複数の毒素生産菌、さらに *A. alternata* の基準株にも共通して分布しており、毒素生産菌と *A. alternata* を識別することはできなかった。一方、形態的に区別できる他種の RFLP パターンは、*A. alternata* や宿主特異的毒素生産菌とは全く異なっていた。以上

の結果から、宿主特異的毒素生産菌と *A. alternata* が共通した遺伝的背景を有することが示され、これら病原菌を同一種とする Nishimura ら<sup>1, 2)</sup> の分類法の正当性が強く示唆された。さらに、rDNA の ITS 領域の塩基配列に基づき *Alternaria* 属菌の系統解析を行った。その結果、宿主特異的毒素生産菌と

*A. alternata* は単一の遺伝的クラスターを形成し、一方、他種菌は系統学的に有意に分岐した別のクラスターに分布した。以上の結果は、宿主特異的毒素生産菌がどれも同一種 *A. alternata* であることを示しており、病原型仮説の正当性が分子系統学的に確認されたものと考えられる。

これら *A. alternata* 病原菌では、腐生菌から病原菌への分化を少数の遺伝子 (宿主特異的毒素生産遺伝子) の獲得として位置付けることができる。したがって、植物病原菌全般の寄生性分化を研究する上で、極めて有効なモデルを提供するものと推察される。現在、筆者らは、これら病原菌の集団遺伝学的解析を進めるとともに宿主特異的毒素生産遺伝子の単離を目指し研究を展開している。

#### 参考文献

1. Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1983). Annu. Rev. Phytopathol. 21:87-116.
2. Nishimura, S. (1980). Proc. Japan Acad. 56B:362-366.
3. Kusaba, M. and Tsuge, T. (1994). Appl. Environ. Microbiol. 60:3055-3062.
4. Bruns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W. (1991). Annu. Rev. Ecol. Syst. 22:525-564.

## No.23別冊特集：

### アンケート「微生物生態と分子生物の出会い」への追加回答

国際基督教大学・教養学部 千 浦 博

アンケートのご依頼を受けながら今日まで回答が遅れましたことをお詫び申し上げます。既に回答期限が切れておりますが、取り敢えず私の意見を申し述べることに致します。御一読賜れば幸いです。

**質問 1.** 分子生物学という前提での研究技法について。

一言で言ってしまうと分子生物学的方法論はとりもなおさず実験室産まれの方法論である。それ故、先ず前提として混在している群衆から標的となる部分についてのみの情報を選択的に取り出すことの上に出来上がっていると理解してよいだろう。今後の微生物生態にとって、このような技法は非常に有効であると同時にどの様な条件下でそれが適正に評価される情報を提供できるかを利用者に十分に知悉せしむるよう努力する責務を担っていると考える。現場で或いは現場から採集された標品に対して分子生物学的方法論を適用する場合に、凡ての情報が一元的に収集可能ではないことを明確にすると共に、その地平をより広げるにはどうすればよいかの検討を繰り返さねばならないと考える。

**質問 2.** 相互交流、協力関係について。

＜i＞現に相互協力の関係は既に始まっていると理解としているし、益々増進させるべきであろう。先の項でも述べたように、分子生物学は実験室でその発展を遂げてきた。言い替えれば、大腸菌、枯草菌などの純粋な実験室分離・飼育菌株について明らかにされた事柄である。それ自身の知見は非常に価値あることであるが、自然界から菌株を分離しようとしても、僅か1%に満たない部分しか培養できない。現今の状況を思うとき、自然界での微生物の本来の在りようを理解しなければ本当に微生物を理解したとは言えない。現在大きな話題となっている、この生存しているが培養できない細菌についても実験室の知識だけでは解答は得られない。その意味においても、両者の協力は必須であると考え。

＜ii＞相互扶助的なチームワークが出来上がることを期待している。フィールドでの仕事を主としてきた、従来からの微生物生態研究者と、分子生物学出身者とは一つの事象を捉えたときに必ずしも同一の視点を持つとは考えられないし、寧ろ違っている事の方が多いだろう。この操作を通して相互啓発が可能になる。その結果は、相互の研究姿勢や論理展開により立ち入った議論が誘発されることになる。往々にして、専修の違いは、思考形態、更に言えば哲学的概念の相違になると考えられるから、ある種の軋轢を両者の間に生み出すであろう。しかし、新たな文化の創成にも似たこの過程を通してのみ更なる発展は期待できるだろう。

**質問 3.** 現状と将来像

＜i＞＜ii＞分子生物学は文字通り、物理学と化学の言葉で生命現象を解説しようとするものであった。それ故、対象になるものについて出来る限り純粋に一定の要素のみを抽出して系を構築し、また所謂還元的手法を用いてこれを解説しようとしてきた。勿論、分子生物学の論理の中には再構成という要素が含まれ、一度部品に分解した諸要素を再度組み立てることにより全体像を構築しようとする部分を含んでいる。しかし、系が複雑化するに従ってその精度は不明確になり、或いはブラックボックスと呼ばれる不明確な部分を残さざるを得なくなる。それでもなお、分子生物学的方法論とその論理は、生命現象の理解に大きな役割を果たしてきたことは言うまでもない。ところで、このような事がなし得てきたのは、先にも述べたように、分子生物学の対象が、純粋培養系を前提としたものであったことに大きく依存している。然るに、微生物生態学の対象は、即ち本来の自然の中で行われるものであり、系としては極めて複雑且つ相互に影響しあう状況の中から営みとしての法則性を見出して行こうとするものであるから、当然定量化する場合に蓋然的にならざるを得

ないだろう。現在の状況では、自然の系そのままに実験的な再現を期待できるほどの、方法論的或いは技術的な意味での手法を我々は持ち得ない。微生物生態学が実験科学である以上、現象のより精緻な情報を得るためには、不完全ながらも実験室での系を構築しそこからの演繹的手法を取り入れざるを得ないだろう。

今日、分子生物学は単独の学としての体系を既に完備しようとする過程を終え、既に各々個別の生物科学分野へ技法として組み込まれてきていると理解できる。換言すれば、1970年代に意図されていた分子生物学の概念はもはや現在のものではなく、この20年余の期間に蓄積されてきた諸々の技法は、それ自身を目的意識として持つことではなく、より学際的な方法論として位置付けられるべき存在となったと言うべきである。生命現象の諸問題のうち、細胞内での諸事象についての解説はかなりの精度でなし得ようになりつつあるとは考えられるが、それは言わば生命全体の系の中では“切りとられた自然”であって、それが生命についての論理を明確に描き出し自然での営みを説明し尽くすことになり得るとは言えない。本来の、自然或いは生命をより現実に近い状態で解説出来得る体系として、微生物生態学を捉えるべきである。その精度をより充実したものにするために分子生物学的方法論が存在していると考えられるべきであろう。

## 蛇 足

私はもともと工学部・工業化学で教育を受けた者である。その私が今は生物学教室で教鞭を採り、海

洋細菌群の生物学的位置付けや、海洋環境中での遺伝子の流れについて興味をもって研究しようとしている。私が工学部から理学部の生物・生化学へと方向転換したのは、学部4年生の時期にワトソンが“二重らせん”なる本を著し、これに大きなインパクトを受けた事に始まる。生物科学の流れはこの時期を境として、生命の本質を解く鍵が生命体自身の中にあることを証明し、分子生物学の勃興・隆盛の時期が出現するに至った訳である。私としては酵母の糖酵素が持つ多糖側鎖部分の構造決定をテーマにした実験を繰返しながら、学会での出来事を遠巻きに見ていた感がある。その後、酵素についての自らのアフィニティーを生かして、部位特異的核酸分解酵素の研究に手を染めたが、時代背景として所謂“制限酵素”を出来るだけ多く手に入れたいと言う社会的要請に応えられるのではないかと言う期待があった。しかし、材料として利用した細菌が海生であったことから、陸生細菌それも大腸菌を対象に発展した方法論は極めて非力で、溶菌操作さえままならない現実直面した。ここで端と気付いたことは、実験室での生物科学、特に分子生物学の殆どは極特殊な状況下での僅かな種類の微生物の挙動を説明しているに過ぎないのではないかと言う疑問である。それ故、大それた願望であるとしても材料や薬品に類する物としての視点で微生物を扱うのではなく、自然の中で最も大きく物質変換に寄与している構成員としての微生物を研究することが生物科学の本道なのだろうと感じた。研究を進めて行く際にこのことは何時も初心として持ち続けたいと思っている。

## 平成7年度共同利用研究等の公募について

本センターでは、平成7年度のワークショップ及び共同利用研究を次のとおり公募します。

### ◎ 公 募 事 項

1. ワークショップ：当センターの教官とセンター外の研究者によって、以下に掲げる検討課題のいずれかに関連し、比較的小人数の研究討論会又は情報交換会をいい、当センター内において実施することを条件とします。また、その成果の詳細は当センターが発行する出版物IGEシリーズに発表されることが期待されます。

#### 検討課題

- ① 想定される地球環境の変化が、地球上に生存する植物の生育、微生物の生活に及ぼす影響についての新しい視点、研究法の解明。
- ② 宇宙環境における植物生育の諸問題。

2. 共同利用研究：当センターの教官とセンター外の研究者によって、当センターにおいて共同で行う研究をいい、次の二つの形態があります。

① 計画研究・予め「計画研究」として決められた特定の共通研究課題について行う研究をいい、継続研究を原則とする。（2年～3年）

平成7年度に「計画研究」として公募する特定の共通研究課題は、「環境制御装置などを利用した遺伝生態的研究」で、環境制御装置などを利用した野生・栽培植物集団、ミクロコスモ、未来環境下での植物・微生物の動態等の実験的解析を行うことを目的とする。

② 一般研究・次に掲げる共同利用研究課題（1～5）のいずれかに関連し当センターにおいて行う研究をいう。

※共同利用研究課題

(1) 菌類等の環境応答と遺伝子発現に関する研究（責任者・大瀧 保）

菌類等の光や重力などの環境因子に対する応答と、それら因子による遺伝子発現の制御機構を研究する。

(2) 植物の環境適応の遺伝生態的研究（責任者・菅 洋）

生態系に豊富に存在する植物の遺伝子の変異を解明し、地球外環境を含む多様な環境への適応現象に有用な遺伝子資源の開発に資する。

(3) トランスジェニック植物の遺伝子発現に関する研究（責任者・亀谷壽昭）

遺伝子組換え植物の種々の発育段階における遺伝子発現及びその安定性について研究する。

(4) 土圏環境における微生物群集の遺伝生態的研究（責任者・服部 勉）

土壌中の微生物群集を各微生物の染色体 DNA の構造的性と関連させて解析する。

(5) 臨界環境における植物、微生物の生活の遺伝生態的研究（責任者・熊谷 忠）

紫外線増加など未来環境に想定される臨界環境に対する植物、微生物の反応を解明するとともに、その遺伝的基礎について研究を行う。

◎ 申請資格者

国・公・私立大学及び国公立研究機関の教官及び研究者です。

◎ 申請書提出期限

平成7年1月27日(金) 期限厳守

◎ 申請書提出先

東北大学遺伝生態研究センター 共同利用掛

〒980-77 仙台市青葉区片平二丁目1-1

※平成7年度の共同利用研究等の公募要項は、すでに関係研究機関あてに送付いたしましたが、ご必要の場合は当センター共同利用掛にお問い合わせ下さい。

## 編集後記

この夏が暑かったためか今年の紅葉は見応えがありません。晴れた日には、正門の脇にそびえている銀杏が金色に輝いてみえます。

ところで、当研究センターでは皆様からの投稿をお待ちしております。遺伝生態という新しい学問分野をめぐる国内外のトピックス・意見・書評などお寄せください。原稿はワープロ・市販の原稿用紙等で作成していただいても結構ですが、お問い合わせいただければ原稿用紙をお送りいたします。


東北大学遺伝生態研究センター通信 No.27  
平成6年（1994年）12月

編集・発行 東北大学遺伝生態研究センター  
〒980-77 仙台市青葉区片平二丁目1-1  
電話 022-227-6200（代表）

共同利用掛（内）3130

FAX 022-263-9845

・研究センター通信の題字は、元東北大学長  
石田名香雄先生の自筆です。

・ は、東北大学遺伝生態研究センターの  
シンボルマークです。

・IGE、Institute of Genetic Ecology の略称  
です。